

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-180336

(43)Date of publication of application : 02.07.2003

(51)Int. CI.

C12M 3/00

C12M 1/32

C12M 1/34

(21)Application number : 2001-360423 (71)Applicant : EFFECTOR CELL INSTITUTE INC

(22)Date of filing : 27.11.2001 (72)Inventor : KANEGASAKI SHIRO  
KIKUCHI YUJI  
KIKUCHI HIROKO

(30)Priority

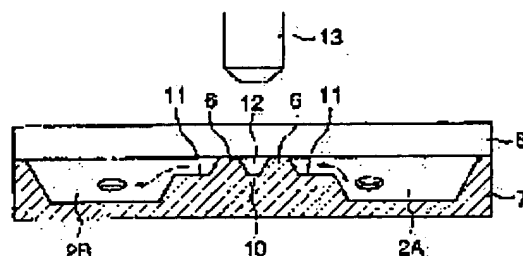
Priority number : 2000372467	Priority date : 07.12.2000	Priority country : JP
2000377120	12.12.2000	
2001209743	10.07.2001	JP
2001258526	28.08.2001	
2001313205	10.10.2001	JP
		JP
		JP

(54) DETECTION OF CELL CHEMOTAXIS AND WELL UNIT FOR CHEMOTACTIC CELL SEPARATOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a well unit that is used for assembling an apparatus which can accurately and easily detect the movement of a cell for itself, in the detection of the chemotaxis of a cell by a chemotactic factor or by the inhibition of chemotaxis by an inhibitor to chemotaxis.

SOLUTION: In this well unit for detecting the chemotaxis of a cell or for the apparatus for isolating an chemotactic cell, a plurality of wells that can statically receive liquid samples are mutually connected to one another via paths. The paths have banks individually. On the upper part of the banks, a plurality of walls are provided so as to form grooves having a width and/or a depth matching the diameter of a cell or its deformability or a flat face is provided. In this flat face, the depth matching the cell



BEST AVAILABLE COPY

diameter or the cell deformability are formed between the glass base plates.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.03.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 16.08.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-180336

(P2003-180336A)

(43) 公開日 平成15年7月2日(2003.7.2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード(参考)
C 1 2 M 3/00		C 1 2 M 3/00	Z 4 B 0 2 9
1/32		1/32	
1/34		1/34	B

審査請求 有 請求項の数19 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2001-380423(P2001-380423)	(71) 出願人	500201406 株式会社 エフェクター細胞研究所 東京都目黒区駒場4-6-2メゾン駒場 401号
(22) 出願日	平成13年11月27日(2001.11.27)	(72) 発明者	金ヶ崎 士朗 神奈川県川崎市多摩区掛形1丁目21-2-503
(31) 優先権主張番号	特願2000-372487(P2000-372487)	(72) 発明者	菊池 佑二 茨城県竜ヶ崎市久保台4丁目1-10-2-506
(32) 優先日	平成12年12月7日(2000.12.7)	(74) 代理人	100082739 弁理士 成瀬 勝夫 (外1名)
(33) 優先権主張国	日本(J P)		
(31) 優先権主張番号	特願2000-377120(P2000-377120)		
(32) 優先日	平成12年12月12日(2000.12.12)		
(33) 優先権主張国	日本(J P)		
(31) 優先権主張番号	特願2001-209743(P2001-209743)		
(32) 優先日	平成13年7月10日(2001.7.10)		
(33) 優先権主張国	日本(J P)		

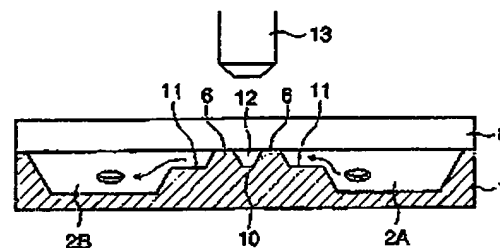
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞走化性検出及び走化細胞分離装置のためのウエルユニット

## (57) 【要約】

【課題】 走化性因子による細胞の走化性又は阻害剤による細胞の走化性阻害を検出するに当たり、細胞の自力に基づく動きを正確にしかも容易に検出する装置を組立てるために用いられるウエルユニットを提供することを目的とする。

【解決手段】 液体試料を静止した状態で収容できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成するべく設けられていることを特徴とする細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニット。



(2)

特開2003-180336

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、ウエルはガラス基板と密着するように形成されていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成するべく設けられていることを特徴とする細胞定化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニット。

【請求項2】 液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁が設けられていることを特徴とする請求項1記載のウエルユニット。

【請求項3】 複数のウエルが流路を介して直列に連通していることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項4】 1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通していることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項5】 1つのウエルに流路を介して連通している複数のウエルの内、少なくとも2つのウエルが流路を介して更に他の共通のウエルと連通していることを特徴とする請求項4記載のウエルユニット。

【請求項6】 複数のウエルが、細胞浮遊液を収納するウエル及び定化性因子を含有する溶液を収納するウエルであることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項7】 複数のウエルが、細胞浮遊液を収納するウエル、定化性因子を含有する溶液を収納するウエル及び定化性因子阻害剤を含有する溶液を収納するウエルであることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項8】 流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項9】 請求項8記載のウエルユニットにおいて、流路に直交して設けられている何れか一方又は双方の壁のまでテラスが形成されていることを特徴とするウエルユニット。

【請求項10】 土手の上部の何れかの箇所に、細胞を検出する画面の位置決めを行うための印を設けることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項11】 流路において、土手が多段に形成されていることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

2

【請求項12】 流路に設けられている溝が、相対するウエルに向かう方向に直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項13】 流路において、相対するウエルに向かう方向の複数の溝の幅が、これに直交する1乃至複数の溝を横切る度に段階的に変化することを特徴とする請求項12記載のウエルユニット。

【請求項14】 流路において、相対するウエルに向かう方向の複数の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていることを特徴とする請求項12記載のウエルユニット。

【請求項15】 流路において、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁の一連の列の前後にテラスが設けられており、且つ、細胞の進行方向におけるテラスの長さが他方のテラスの長さより長いことを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項16】 流路において、中央にテラスを設け、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁の列が該テラスを挟んで2箇所に形成されており、所望により、隔壁の列の外側にもテラスが設けられていることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項17】 土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を、相対するウエルに向かう方向に直交して設けることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項18】 土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を、隔壁の列に並行して設けることを特徴とする請求項1又は2記載のウエルユニット。

【請求項19】 請求項1乃至18記載のウエルユニットの夫々を1ユニットとし、同一又は複数種のユニットを複数個集積してなることを特徴とする細胞定化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニット。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞が自力で一定の方向に移動するか否かの判定、細胞が自力で一定の方向に移動する状態の観察、或いは一定の方向に自力で移動した細胞の数を計数するための装置、即ち、細胞定化性検出装置、更には、細胞が選択的に自力で一定の方向に移動することを利用する細胞の分離装置において用いられるウエルユニットに関わる。

【0002】

【従来の技術】細胞の定化性をin vitroで検出する装置としてボイデンチェンバーが使用されてきた。これは、細胞が通過できる大きさの穴（直径3〜8μm）があいているフィルターで上室と下室とに2分された構造

(3)

特開2003-180336

3

を有し、上室に細胞浮遊液を、下室に走化性因子を含む換体溶液を入れ、走化性因子に向かって移動する細胞がフィルターを通過し又はフィルターの裏面に現れた数を観察する装置である。今日最も普通に使用されている装置であるが、細胞浮遊液の量として、 $1 \times 10^5$  cells/mlの濃度の浮遊液を1/4ml~1/20ml要する。これは、細胞数にして、少なくとも $5 \times 10^4$ 個を必要とすることを意味する。多量に得られる細胞を対象とする場合はさしたる問題はないが、例えば、好酸球は抹消白血球に占める割合が1~5%程度、好塩基球は同じく1%以下、単球は同じく1~2%程度であり、このような少量のみ存在する細胞を対象とする場合は、必要量を手に入れるために多くの労力を要する。また、マウスのような小動物を用いる場合、採血可能な量は限られており、一頭あたりせいぜい1.0ml程度である。更に、がん細胞や組織に存在する細胞にも多量には入手しにくい細胞があり、その性質を調べるには使用量が少ないことが望まれる。また、ボイデンチャンバーにおいては、移動する過程にある細胞の形態の観察や数の計数を行うことができない。

【0003】細胞の走化性を数個のレベルで観察できる定性用スライドガラスが市販されている。これは、25×75mm、2mm厚の顕微鏡ガラススライド上に、1mm幅のブリッジ（流路）を挟んで幅4mm、長さ25mm、深さ1mmの溝（ウエル）が2個設けられている。即ち、二つのウエルが流路を挟んで連通した形を有している。一方のウエルに細胞浮遊液を入れ、他方のウエルに走化性因子を含有する換体溶液を入れ、カバーガラスを被せて、一方のウエルから流路を越えて他方のウエルへ移動する細胞を顕微鏡で観察する。然し、ブリッジが細胞の径又は変形能に合わせた空間を形成することは想定されていない。また、流路に細胞が通過する溝は設けられていない。更に、一個のウエルの容積が100μlであり、少なくとも1/10mlの細胞浮遊液を要する。また、同様な構造のものとして、スライドガラス上に、同心円状に二つの溝（ウエル）を設け、その間をブリッジ（流路）で隔てたケモタキシスチャンバーが市販されている（ウェーバーサイエンティフィック社製、商品名 ダンケモタキシスチャンバー）。これは、内側のウエルに細胞浮遊液を、外側のウエルに換体を夫々入れ、カバーガラスを被せて、流路を通過する細胞を顕微鏡で観察するものである。流路はカバーガラスより20μm低く設定されており、細胞はその隙間を通過する構造である。ここで、流路の平面とカバーガラスとの間で形成される隙間は細胞の径又は変形能とは無関係に設定されており、また、流路には細胞が通過する溝が設けられていない。

【0004】血液レオロジーの計測のために、シリコン単結晶基板表面に半導体作製技術を利用して微細な溝を複数本設けてなる流路を備えた装置が提案されている

(Kikuchi 他、SPIE Vol.2978、165-171(1997)、Kikuc

4

hi 他、Microvascular Research Vol.44、226-240(1997)、菊池他、生物物理 214号254-258(1997)）。これは、流路を挟んで圧力差を与えることにより血球浮遊液の流れを作り、血流の状況を観察し研究しようとするもので、細胞レベルでの挙動を観察することを可能とするものであるが、血球の自力による移動を観察乃至計測することを目的としていない。

【0005】特許2532707号公報には、一端部に流入口を有し、他端部に流出口を有する大きな溝を並列に配置し、且つ、この溝を区画する隔壁に、前記流入口と流出口とを結ぶ直線に対し直交する方向において、溝相互を連通する微細な溝を設けてなる血液回路が記載されている。これは、大きな溝の一つに血液試料を流し、他方の溝に走化性因子を含む換体を流しておき、血液試料の一部のみを微細な溝（流路）に導き、微細な溝（流路）を通過する細胞を検出することで、細胞の動きや機能をチェックし、或いは走化性を観察・測定するものである。大きな溝により血液試料及び走化性因子を含む換体が循環する流れを作るため、血液試料や換体溶液を静止した状態で収納するウエルを有さず、血液試料及び換体が相当量必要であり、微量な試料を用いて細胞の性質を調べるには不向きである。

【0006】血液中の細胞を微細な溝を通過させ、通過中の血球の態様を観察するための血液フィルタが知られている（特許2685544）。これは、シリコン基板表面に微細な溝を有してなる第1の基板と、第1の基板の表面に接合される平面を有する第2の基板とからなり、両基板の接合部に第1の基板の溝によって形成される空間を血球が通過する構造である。然し、血球を微細な溝を通過させるために加圧又は吸引等外部から力を加えており、細胞の自力による溝の通過を観察するものではない。即ち、血液試料や換体溶液を静止した状態で収納するウエルを有さない。

【0007】細胞膜の硬さや細胞の変形能の機能的な側面での分画処理を行うために、分画処理すべき細胞を多数の微細な溝を有する流路を通過させ、通過し得ない細胞と通過する細胞とを分ける装置も知られている。その中で、溝の幅が異なる流路を2段に設け、何段階かに細胞を分画することも提案されている（特許2685119）。然し、これは細胞を含む液を加圧下に移動させる構造であり、細胞の自力による移動を捉えるものではない。

【0008】微細な溝を設けた流路を有する基板を傾斜ね、多量の細胞懸濁液を通過、分画可能とした積層マイクロチャネルアレイ装置も知られている（特開平11-165062）。これも、細胞を含む液を加圧下に移動させる構造であり、細胞の自力による移動を捉えるものではない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、走化性因子による細胞の走化性又は阻害剤による細胞の走化性阻害

(4)

特開2003-180336

5

を検出するに当たり、細胞の自力に基づく動きを正確にしかも容易に検出する装置のためのウエルユニットを提供することを目的とする。ここに、自力に基づく動きとは、圧力等の影響を受けることなく、細胞が自らの運動により移動する状態を意味し、走化性因子の作用を高い信頼度で検証し、確認するために重要な事項である。かかる細胞の自力に基づく動きを正確に検出するためには、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶことが重要であるが、かかる状態を微細なウエル内で作り出すことができるウエルユニットの構造は知られていない。

【0010】また、本発明は、少量の細胞試料を用いて細胞の走化性を検出することができる装置のためのウエルユニットを提供することを目的とする。加えて、本発明は、細胞の走化性物質及びそれを阻害する物質の検出を、一度に多数の検体につき、効率よく行う装置のためのウエルユニットの提供を目的とする。更に、本発明は、複数種の細胞の混合液から特定の細胞を選択的に分離採取する装置のためのウエルユニットを提供すること、その目的の一つとする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、ウエルはガラス基板と密着するように形成されていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成するべく設けられていることを特徴とする細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニットであり、また、液体試料を静止した状態で収納できるウエルの複数個が流路を介して互いに連通していること、流路には土手が設けられていること、土手の上部には細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁が設けられていることを特徴とする該ウエルユニットである。かかる、土手を設けること、或いは土手に溝を構成する隔壁を設けることにより、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。この効果は、土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を相対するウエルに向かう方向に直交して設けること、或は、土手の上部に、細胞をスタートラインに並べる際に細胞の移動を制限するための障害物を、隔壁の列に並行して設ける構造を採用することにより、更に高められる。

【0012】ここで、複数のウエルは、流路を介して直列に連通していることができ、或いは、1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通しているように、更に

6

は、1つのウエルに流路を介して連通している複数のウエルの内、少なくとも2つのウエルが流路を介して更に他の共通のウエルと連通しているようによい。

【0013】上記の複数のウエルは、細胞培養液を収納するウエル及び走化性因子を含有する溶液を収納するウエルであり、或いは、細胞培養液を収納するウエル、走化性因子を含有する溶液を収納するウエル及び走化性因子阻害剤を含有する溶液を収納するウエルである。

【0014】本発明のウエルユニットは、流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方又は双方において、流路の近傍における液体の量を制限するために、流路に直交して壁を設けることができ、更に、このウエルユニットにおいて、流路に直交して設けられている何れか一方又は双方の壁のまでテラスが形成されているようによい。

【0015】本発明のウエルユニットにおける土手の上部の何れかの箇所に、細胞を検出する画面の位置決めを行うための印を設けることができ、また、流路において、土手が多段に形成されているようによい。

【0016】本発明のウエルユニットにおいて、流路に設けられている溝が、相対するウエルに向かう方向に直交する1乃至複数本の溝で互いに連通していることができ、或いは、流路において、相対するウエルに向かう方向の複数本の溝の幅が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に段階的に変化すること、更に、流路において、相対するウエルに向かう方向の複数の溝が、これに直交する1乃至複数本の溝を横切る度に、相互の位置をシフトさせて形成されていることができる。

【0017】本発明のウエルユニットにおける流路において、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁の一連の列の前後にテラスが設け、且つ、細胞の進行方向におけるテラスの長さが他方のテラスの長さより長することができる。

【0018】本発明のウエルユニットの流路においては、中央にテラスを設け、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する隔壁の列が該テラスを挟んで2箇所に形成されており、所望により、隔壁の列の外側にもテラスが設けられているようによい。

【0019】本発明に関わる上記の各ウエルユニットの夫々を1ユニットとし、同一又は複数種のユニットを複数個集積して細胞走化性検出及び細胞分離装置のためのウエルユニットとすることもできる。

【発明の実施の形態】

【0020】本発明に関わる細胞走化性検出及び走化細胞分離装置のためのウエルユニットは、複数のウエルが流路を挟んで結合し、互いに連通する構造を有する。ここで、ウエルとは、細胞懸濁液又は細胞走化性因子や走化性因子阻害剤等の検体溶液を収納する容器である。流路とは、二つのウエルを追追させている部分であって、

(5)

特開2003-180336

7

一つのウエルから他方のウエルに細胞が移動するときに細胞が通過する通路である。通路には、後述する土手が設けられ、土手には、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び／又は深さの溝を1乃至複数本構成する障壁が設けられているか、又は平面が設けられており、該平面はガラス基板との間で細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成するべく設けられている。なお、細胞の変形能とは、細胞が弾力性を有するものであるとき、その弾力性のために容易に形を変え、扁平状やひも状などの形態をとり、通常、細胞が自由空間でとる形状（球状）において有する径よりも狭い隙間を通り抜けることを言う。

【0021】かかる隙間を設けることにより、細胞が隙間という障害を越えて移動することになり、細胞の自力による移動に障害を加えることで、より正確に細胞の定化性を判定することが可能となる。かかる隙間を形成するために、土手を設けること、或いは土手に溝を構成する障壁を設けることにより、ウエルに入れた細胞が、定化開始前に通路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。更に、細胞が個体毎に通過する溝を設ける場合は、細胞を個々のレベルで観察することが可能となり、又、細胞を所望の種類ごとに分離することができる。

【0022】本発明は、かかる細胞定化性検出及び定化細胞分離装置において用いられるウエルの結合様式、ウエルの構造及び通路の構造に関する。

【0023】図1は、本発明のウエルユニットが組み込まれた細胞定化性検出及び細胞分離装置の一例を示し、図2は図1の装置で用いられるウエルユニットの上面図である。図の例では、ウエルユニットは、細胞浮遊液や検体溶液等の試料を収納するウエル2A、2Bを有し、これ等のウエルを隔てる土手10の上面に溝5を構成する障壁6が設けられている。ウエルユニットには光学的に透明なガラス基板8が密着して装着され、密閉された空間を構成する。なお、本明細書においては、土手10と溝5を構成する障壁6を含む部分構造を通路と呼ぶこととする。ウエル2の一つ（2A）に細胞浮遊液を入れたとき、細胞は、他方のウエル（2B）の検体溶液が定化性因子である場合はウエル2Bに向かって移動しようとし、通路を通過する。細胞の移動の状態は検出器13、例えば顕微鏡により観察される。この装置の他の用途として、ウエル2Aに種々の細胞の混合懸濁液を入れておき、ウエル2Bに特定の定化性因子を入れることにより、ウエル2Aからウエル2Bに移動した細胞を採取することで、定化性因子に反応する細胞を選択的に分離することを挙げることができる。

【0024】図3は、本発明のウエルユニットが組み込まれた細胞定化性検出及び細胞分離装置の他の例を示す。1は通路、2A、2Bは細胞浮遊液や検体溶液等の試料を収納するウエルであり、試料はマイクロピペット

8

等により管3A又は3Bを通じてウエル2A又は2Bに供給される。移動後の細胞をウエル2A又は2Bから採取する場合も、マイクロピペット等により管3A又は3Bを通じて行われる。

【0025】試料の一つである細胞浮遊液を、マイクロピペット等により管3Aを通じてウエル2Aに供給する際、注入する液圧により細胞が通路1を通過して反対側のウエル2Bに移動してしまうことが生じる。これは、細胞の移動が検体の有する定化性によるのか否かの判定に混乱を与える要因となるとともに、細胞の分離を目的とする場合は、所望の細胞に他の細胞が混合してしまうことになり目的が達せられないことになる。同様に、検体溶液を、マイクロピペット等により管3Bを通じてウエル2Bに供給する際、注入圧により検体溶液が通路1を通過して反対側のウエル2Aに入り細胞浮遊液と混合する事態が生じ、細胞がその定化性により通路1を通過する現象が混乱乃至阻害される。

【0026】この問題点を解決するために、管3と連通するように管4を設け、管3に加わる注入圧を管4の方向に逃がし、通路1に向かって細胞が強制的に流れることを防止する構造が採用される。即ち、試料を注入する管3に連通する管4を設けることにより、水平方向への液圧の影響を最小にすることができ、検体溶液が細胞定化性を有するかどうかの判定をより正確に行うことができる。管4による圧力差の緩和作用は、ウエルから細胞などの試料を採取する際の液圧を緩和する上でも有効であり、試料の採取を容易にする。

【0027】本発明は、かかる装置においても使用できるウエルユニットを提供する。図4には、かかる装置において使用できる本発明のウエルユニットの一例が示されており、ウエル2Aには、管3A、4Aを設けるための貫通孔3Aa、4Aaが、ウエル2Bには、管3B、4Bを設けるための貫通孔3Ba、4Baが、夫々、設けられている。

【0028】図5(1)、(2)は、本発明のウエルユニットが組み込まれた細胞定化性検出及び細胞分離装置の他の例を示す。図5の装置においては、ウエルに試料を注入し、或いはウエルから試料を採取する際の圧力の影響を少なくするために、図5(1)に示すように、管3A、3Bの上端部3Ab及び3Bbにより共有される空間15が設けられている。ウエル2A、2B、管3A、3B及び空間15を、細胞等の試料に影響を与えない液体で満たすことにより、全体が一定の圧力下に保たれ、管3A又は3Bから試料を注入・採取する際の水平方向の圧力変化が緩和される。

【0029】本発明が提供するウエルユニットは、かかる装置において使用できるウエルユニットも含む。図5(2)には、かかる装置において使用できる本発明のウエルユニットの一例が示されており、ウエル2Aには、管3Aを設けるための貫通孔3Aaが、ウエル2Bには、

9

管3Bを設けるための貫通孔3Baが、夫々、設けられている。

【0030】図5に示す装置の応用例として、図6(1)に示すように、各ウエル2A、2Bに管3A・3B、及び直通管4A・4Bを設け、各管の上端部に、液体を入れるための空間15を設けることができる。この場合に用いられる本発明のウエルユニットは、図6(2)に示すように、各ウエルに二個ずつの貫通孔が設けられる。なお、図6には、流路1における土手10に隔壁が設けられていないウエルユニットの使用例を示してある。

【0031】本発明のウエルユニットにおいては、複数のウエルを目的に応じて種々のモードで結合させ、互いに連通させることが可能である。本発明は、複数のウエル2が、種々のモードで、流路1を介して結合し互いに連通した構造のウエルユニットを含む(図7～図14参照)。

【0032】また、本発明は、できるだけ少量の細胞を用いて走化性を調べることができるように、流路に対するウエルの構造を設定する場合を含む(図15、図15参照)。

【0033】流路1には、細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び又は深さの溝を1乃至複数本、例えば、約20～約100本構成する隔壁を設けることが好ましい。かかる溝を設けることにより、細胞や検体の拡散状況を調節し、細胞の動きをより正確に、且つ、個々のレベルで観察することが可能となる。更に、溝を設けることは、細胞のウエル内における位置の調節を容易に行うことを可能にする。即ち、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。本発明のウエルユニットは、目的に応じて、隔壁の種々の構造を採用することができ(図19～図25参照)。

【0034】流路1には、テラスを設けることができ、テラスの構造を種々変えることにより、流路を通過した細胞、或いは通過する細胞の状況を観察することが容易になる。また、ウエル内における細胞の流路に対する位置関係を調整することが可能となる。本発明は、かかるテラスの構造を有するウエルユニットに関わる(図26～図31参照)。

【0035】本発明のウエルユニットは、流路を介するウエルの結合を一つのユニットとする時、複数のユニットを集積させた場合を含む(図33～図37参照)。かかる集積により、一度に多種類の細胞・検体を処理することが可能な細胞走化性検出又は細胞分離装置を組み立てることができる。

【0036】本発明のウエルユニットを備えた細胞走化性検出及び細胞分離装置における、細胞の移動の観察乃至流路を通過中又は通過後の細胞数の計数は、図1、図3、図5或いは図6に示すように、流路1に検知装置、例えば顕微鏡をセットすることにより行われる。また、顕微鏡－ビデオカメラ、或いはCCDカメラを組み

(5)

特開2003-180336

10

合わせることにより、自動的に細胞の移動する経過を記録することが可能となる。

【0037】流路1を通過する細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡で捉えることにより行うこともできるが、常法に従い、予め細胞を発光・蛍光物質でマーキングしておき、その発光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・計数することができる。

【0038】本発明によれば、後述するように、装置の全体を小型化することが可能であり、試料の処理を微量で行うことができ、しかも各ユニットを多数集積させて、多数検体の処理を同時に行うことが可能となる。更に、液体の吸引・注入量のプログラム制御により自動化して行うことが容易である。

【0039】装置の自動化は、ユニット単体、同一又は複数種のユニットを複数個集積させてなる集積ユニット又は複数の集積ユニットよりなるユニット部と共に、細胞貯蔵部、検体貯蔵部、必要に応じてピペット洗浄部及びこれ等各部を移動する細胞や検体等の試料供給ピペットを備え、且つ、これ等ピペットの作動を制御する機構を備えることにより、細胞や検体等の供給・採取も含めた装置全体を自動制御することができる。更に、複数のユニット上の流路における細胞の状態を検出するために検出器をスキャンさせ、一定時間毎に繰返し検出し、細胞の動きを経時的にトレースするよう検出器を制御することも可能である。これ等の制御は、コンピュータープログラムにより容易に行われる。

【0040】本発明に関わるウエルユニットの構造を更に具体的に説明すれば、次の通りである。

【0041】1) ウエルユニットの構造

図2、図4及び図6に例示するように、流路及びウエルは基板7上に一体的に構築されるのが好ましく、基板7には、必要に応じ、各ウエルに通じる管と連絡する穴(貫通孔)が設けられる。流路には土手10が設けられる。土手の上部は、平面であるか、溝5を構成する隔壁6及び必要に応じてテラス11が設けられる。土手10を設けること、或いは土手10に溝5を構成する隔壁6を設けることにより、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。即ち、ウエルの一つに細胞懸濁液を入れた後、流路を介して反対側にあるウエルから適量の液体を吸引することにより細胞が流路の近傍に集められる。このとき、土手10又は土手10と隔壁6の存在により、細胞は進行方向に対して直交する方向に並ぶ。次いで、反対側のウエルに走化性因子が注入されると、細胞が流路の通過を開始する。流路の近傍に細胞が集まっていない場合、或いは、並んだ状態にないときは、細胞の動きが不規則的になり、所謂、細胞のランダムムーブメントの故に、走化性の検出を明確に行うことが困難となる。このウエルユニットを用いて、細胞走化性検出及び細胞分離装置を組み立てるには、1) ウエル

11

及び流路を設けた基板7にガラス基板8をのせる(図1参照)、或いは、2) ウエル、流路及び貫通孔を設けた基板7に、貫通孔に相当する管を穿ったブロック9を、各管が基板上の各貫通孔に合致するように固着し、更にガラス基板8を密着固定する(図3、図5、図6参照)。なお、ブロック9、基板7及びガラス基板8はO-リングで締め付ける等により圧着・固定してもよい(図3参照)。

#### 【0042】2) ウエル

ウエル2は、試料、即ち、細胞培養液又は分化性因子含有溶液、或いは、同阻害剤含有溶液等の検体溶液を収納するもので、容積は、特に制限は無く、必要最小限の液量を収納できればよい。例えば、液量0.3μlを収容する場合は、深さ0.1mm、幅1.2mm、長さ2.5mmあればよい。

#### 【0043】3) 流路を介したウエルの連通様式

流路を介したウエルの連通様式は、図2、図4、図5(2)或いは図6(2)に例示する2連式、図7、図8に例示する3連式が通常用いられる。図2及び図7は貫通孔が設けられていない場合であり、図4、図6、図8は貫通孔が設けられている場合の例示である。3連式の場合は、例えば、ウエル2Aに細胞培養液、ウエル2Bに阻害剤含有液、ウエル2C分化性因子含有液を入れることにより、複数検体につき3者の関係を一度に調べることができる。

【0044】ウエルは、必要に応じて更に結合させ、連通させることができる。連通の形式として、図7や図8のような直列型の他に、図9～図11に例示するように、一つのウエルの周りに流路を介して複数のウエルを連通させた、所謂、同心状の形式をとることもでき、更に、図12、図13の如く、同心円状にすることもできる。図12、図13は、3連式を同心円状にした例である。

【0045】図9～図11の場合、中央のウエル2Aに細胞培養液を入れ、ウエル2B、に種々の検体を入れることにより、複数の分化性因子の検索を同時に行うことができる。更に、複数種の細胞を含む試料をウエル2Aに入れることにより、細胞の種類別に分離することを一度に行うことができる(ソーティング)。例えば、ウエル2B、に細胞の種類に対応した分化性因子を入れ、中央のウエル2Aに複数種の細胞を含む試料、例えば全血を入れる。細胞は、夫々の分化性因子のある各ウエル2B、に向かって移動する。一定時間経過後に、各ウエル2B、から細胞を採取する。

【0046】図14には、1つのウエル(2A)に流路を介して連通している複数のウエルの内、少なくとも2つのウエル(2B、及び2B<sub>2</sub>)が相互に流路を介して更に他の共通のウエル(2C)と連通しているタイプが例示されている。この場合、ウエル2Aに細胞培養液を、ウエル2Cに分化性因子を含有する検体溶液を入れ、ウエル2B、及び2B<sub>2</sub>に夫々異なる阻害剤を含む検体溶液を入れ

(7)

特開2003-180336

12

ることにより、夫々の阻害剤の性質を同一条件下で比較しながら調べることができる。

【0047】4) ウエルの構造における特定の態様  
流路を介して互いに連通しているウエルの何れか一方、例えば細胞を収納するウエル、又は双方において、流路の近傍における液体又は細胞懸濁液の量を制限するべく、流路に直交して壁を設けることにより、ウエル内における細胞の流路に対する位置関係を調整することが容易となり、或いは、検体試料の流れを調整することが容易となる(図15)。図15は、流路1を介してウエル2A、2Bが連通しており、夫々のウエルに、流路1に直交して壁14A及び14Bが設けられている場合を示す。試料注入管3Aからウエル2Aに細胞を注入すると、一定量の細胞が壁14Aと流路1の間に集まる。壁14と流路1との間隔は任意に設定できるが、通常は50～300μmから選ばれる。

【0048】図16は、流路に直交して壁を設けたウエルと流路の変形例を示しており、(1)はウエルの帽の一部に流路が設けられている場合を、(2)は流路が中央で二分されており、流路を挟んで一個のウエル(2A)に対し二個のウエル(2B、2C)が設けられていると共にウエル2A側にのみ壁14Aが設けられている場合を、(3)は流路において障壁の列がテラス11を挟んで二列設けられている場合を、夫々示している。このような変形は例示として挙げたもので、これ等に限定されないことは言うまでもない。

#### 【0049】5) 流路

流路1(図3、5、6、8～16)の構造の一例を図1～6、図17、18により説明すれば次の通りである。流路1は、両端のウエル2Aとウエル2Bを隔てる土手10(基板7上の突出部)とガラス基板8との間で細胞が通過する空間を形成する。土手10の上部は平面であるか(図6参照)、又は、溝5を構成する障壁6及び必要に応じ、テラス11が設けられる。なお、図17は、図1に示す構造の装置における例であり、図18は図3や図5に示す構造の装置における例である。

【0050】土手10は、流路1の両端にあるウエル2A、2Bを隔てるもので、そのサイズは、特に限定されるものではないが、例えば、高さ0.03～0.1mm程度、相対するウエルに向かう方向における長さとして0.01～0.5mm程度あればよく、相対するウエルに向かう方向に直交する方向における長さは、ウエルの帽又はそれ以下でよい。

【0051】土手の上部に溝を構成する障壁を設けない場合は、土手の上面がガラス基板との間で細胞の径又は細胞の変形能に合わせた深さ乃至隙間を形成する。この場合の深さは、細胞の種類に合わせて、通常3～50μmから選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T細胞、B細胞等の場合は3～10μm、例えば6、7、8又は10μmから選ばれ、がん細胞や組織に

(8)

特開2003-180336

13

存在する細胞の場合は10~20 $\mu$ mの幅が選ばれる。

【0052】6) 流路における階壁及び階壁により構成される溝

土手10の上面には、図19で示すように、階壁6を設けることができる。階壁6により構成される溝5の断面は、V字型断面、凹型断面、半円型断面等、任意の形状とすることができる(図20参照)。

【0053】溝5の幅は、通常は3~50 $\mu$ mから選ばれ、対象とする細胞が1個ずつ通過するだけの幅であることが好ましく、細胞の種類に合わせて好適な幅が選ばれる。好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、T細胞、B細胞等の場合は3~10 $\mu$ m、例えば6、7、8又は10 $\mu$ mから選ばれ、がん細胞や組織に存在する細胞の場合は10~20 $\mu$ mの幅が選ばれる。

【0054】溝5の深さ(階壁6の高さ)は、顕微鏡の焦点深度に合わせて適宜設定するか、或いは、細胞が1個ずつ通過し得る深さとすることができる。更には、溝の幅と溝の高さの双方を細胞が1個ずつ通過し得る幅と高さに設定しても良い。

【0055】溝5の深さを、細胞の移動を観察する際の顕微鏡の焦点深度内に収まる深さにする場合、例えば、10~40倍の顕微鏡の焦点深度に合わせて場合は4.5 $\mu$ m程度が好ましいが、これに限定される必要はない。

【0056】溝5の数は、流路の幅に対する階壁の幅と溝の幅で決定される。例えば、流路の幅1mm、階壁の幅10 $\mu$ m、溝の幅5 $\mu$ mの場合、溝の数は最大で55本となる。検出・観察に適した溝5の数は、1乃至約100本、好ましくは好ましくは約10乃至約70本である。

【0057】階壁6の長さは、約5~約400 $\mu$ mから選ばれ、例えば、5、10、20、30、40、60、100、200、300又は400 $\mu$ mのものが用いられる。階壁6自体の幅は適宜選ぶことができる。後述する図25に示す構造を採る場合は縦横の長さかほぼ等しい方が効果的である。

【0058】流路1を形成する溝5は、図21、図22に例示することく、相対するウエルに向かう方向に直交する1乃至複数本の溝12で互いに連通していてもよい。かくすることにより細胞が通過する様子をより正確に把握することができる。その場合、図23、図24の如く溝5の幅を、相対するウエルに向かう方向でこれに直交する溝12を横切る度に段階的に変化させても良い。なお、図23では、階壁6自体の幅が変化する例を示しているが、図24に示すように、同一の大きさを有する階壁6の数を増減させることにより溝5の幅を変化させることもできる。

【0059】図25に例示する如く、相対するウエルに向かう方向の複数の溝5が、これに直交する溝12を横切る度に、相互の位置関係をシフトさせて形成されていてもよい。図25は、相対するウエルに向かう方向の溝5が、それと直交する溝12を横切る毎に、5aと5bのように、2分の1ピッチずつ位置関係を変えて形成されている場合を示す。溝5をこのように形成させることにより、

14

定化性因子や阻害物質を含有する検体溶液の拡散を充分に行わせることができ、相対する流路に向かう方向での検体溶液を均一に分布させることができると共に、細胞や検体の注入・採取による昇圧・減圧をより効率よく回避することが可能となる。

【0060】更に、階壁6は、図26に例示する如く相対するウエルに向かう方向に繋がった連続形であっても良い。

【0061】7) 流路における、画像の位置決めのための印

流路を通過する細胞の状態を検出するに当たり、検出器13が一定時間経過毎に所定の流路上に戻り、繰返し検出を行う場合がある。例えば、後述するように、複数のウエルユニットを集積させた装置において、各ウエルユニットの流路を通過する細胞の状態を検出するために、検出器13をスキャンさせ、経時的に検出を行う場合である。このような場合、所定の流路においては検出画面の範囲が毎回同じになるよう、画面の位置決めを容易にするために、流路上の何れかの位置に印を設けると便利である。印は位置決めを容易にするために役立てば、如何なる形状でも良い。また、印を設ける箇所は、土手10の上部、例えば後述のテラス11の何れかの箇所、或いは、何れかの階壁の上部であっても良い。また、設ける印の数は、1個に限らず、複数個であっても良い(図27、図28(1)参照)。

【0062】8) 流路におけるテラス

土手の上面に、例えば図1、図2において符号11で示す平面を設けると細胞の通過が観察しやすくなる(この平面をテラスと呼ぶことにする)。テラス11は必須のものではないが、設けることが好ましい。図2に示すように、テラス11を階壁6の列の両側に設ける場合、その相対するウエルに向かう方向の長さは約0.03mm乃至約0.4mmから適宜選ばれる。また、図27に例示するように、階壁6の列の両側に設けられたテラス11<sub>1</sub>、11<sub>2</sub>の内、一方(図27では、11<sub>1</sub>)を他方(図27では、11<sub>2</sub>)より長くすることもできる。かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞の観察が容易になる。

【0063】なお、図27には、土手上面に+印(23)が設けられた例が示されているが、この印は必要に応じて設けられればよい。

【0064】土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで階壁の列を2箇所形成することもでき(図28参照)、かかる構造とすることにより、溝を通過した後の細胞が中央のテラス上に存在する時間が長くなり、観察・計数が容易に行われる。なお、中央のテラスの大きさは、顕微鏡の視野でカバーできる大きさであることが望ましい。図28において、(1)は上面図、(2)は断面図である。

【0065】図28には、画像の位置決めを容易にするための印(23)が2箇所に設けられている場合が例示されて

JP,2003-180336,A

☒ STANDARD ☐ ZOOM-UP ROTATION No Rotation ▾ ☐ REVERSAL

RELOAD

PREVIOUS PAGE

NEXT PAGE

DETAIL

(9)

特開2003-180336

15

いるが、この印は必要に応じて設けられれば良い。

【0066】図29〜図31は、図15、図16に示すタイプのウエルにおいて、流路にテラスを設けた例である。なお、図29〜図31の(1)は上面図、(2)は、(1)における破線で示した部分の断面図である。図29は流路を挟んで両側に、流路に直交する壁14A、14Bまでテラス11A、11Bが設けられている場合を示す。図30は流路の片側においてのみ、流路に直交する壁14Aまでテラス11Aが設けられ、反対側においては壁14Bに達しないテラス11Bが設けられている場合を示す。図31は、細胞が注入されるウエル2A側のみ流路に直交する壁14Aが設けられている場合において、該壁14Aまでテラス11Aが設けられている場合である。図15、図16に示すタイプのウエルにおいて、かかるテラスを設けることにより、ウエル2B側に入れた走化性因子や阻害物質がウエル2A側へと滲れを通り抜けた後に、それ等の拡散が急激に進むのを防止することができる。かかるテラスがない場合は、流路の近傍の容積が大きいため、拡散が急激に進むことになる。

【0067】なお、図32に例示するように、土手10を多段に形成すること、即ち、土手10のテラス11を多段式に形成することにより、一方のウエル側から吸引すると他方のウエルに入れた細胞が土手10の近傍に集まり易くなる。例えば、細胞が好中球、好酸球、好塩基球等である場合、テラス11、及び11'のガラス基板8からの距離（図においては隔壁9の長さ）を3μm、テラス11、及び11'のガラス基板8からの距離を4.5μmとし、ウエル2Aに細胞を入れ、ウエル2Bの側から液を吸引すると、細胞はテラス11、のところで一旦止まった後、テラス11、とガラス基板8との間に集まり易くなる。各テラス11、のガラス基板8からの距離は、取扱う細胞に応じて適宜設定することができ、概ね3乃至5μmの範囲で設定され得るが、これに限定されるわけではない。ここで、細胞を収納するウエルの反対側のテラス（11、）の長さを、細胞を収納するウエルの側のテラス（テラス11、）より約1.5乃至5倍長くすると、滲れを通り抜けた細胞の観察や計数をより容易に行うことができる。

【0068】9）流路における障害物

走化性因子を入れる前に、他方のウエルにおいて細胞が同じ条件で、細胞の進行方向に向かってスタートラインに並ぶようにするための構造の一つとして、流路に細胞の移動を制限するための障害物を設けることが提案される。ここに云う障害物とは、細胞の移動を完全には遮断することなく、その移動を制限するもので、例えば、一連の突起の並び、一連の三角柱や四角柱の並びを挙げることができるが、この目的を達成し得るならば如何なる形状でも採用し得る。障害物が設けられる位置は、土手の上部であることが好ましいが、目的を達成するのであれば、土手の上部に限られない。土手の上面に隔壁が設けられておらず、全面がテラスである場合はその一端付

16

近に設けられる（図40(1)参照）。土手の上面に隔壁とテラスが設けられている場合は、隔壁の列に並行して、テラスのウエル側に設けられる（図40(2)〜(4)参照）。なお、図40において、(1)、(2)及び(4)は障害物として突起の並びが採用された場合の例示であり、(3)は三角柱の並びが採用された場合の例示である。障害物の高さは、細胞の径又は変形能に合わせた長さと同等かその2分の1乃至4分の1あればよい。障害物の間隔は、通常は、細胞の径又は変形能に合わせた長さと同等に設定されるが、高さが低く設定されている場合は、それより短く設定されていてもよい。

【0069】10）多数のユニットの配列

流路を介して連通した複数のウエルを1ユニットとして、複数のユニットを1枚の基板上に配置乃至集積して多数個体を同時に処理するウエルユニットとすることができ、同じタイプのユニットを並列に配置する場合（例えば図33〜35）、円形に集積する場合（例えば図36）、異種のユニットを配列する場合（例えば図37）等、必要に応じて種々の配置乃至集積をすることが可能である。以下に各図に基づいて配置乃至集積の様式を説明するが、もとよりこれ等は例示であり、これ等に限定されるものではなく、目的に応じて種々の組み合わせを採ることができ、

【0070】図33及び図34は、図36に示す、2つのウエルが流路を介して連通してなるウエルユニットが、1辺が16mmの正方形である一枚の基板7上に12個設けられた場合を示す。1ユニットの大きさは長辺が5.7mm、短辺が1.2mm、ユニットの間隔は0.8mmで配置されている。なお、図33では、基板7に設けられた貫通孔3a及び4aが四角形であるのに対し、図34は貫通孔が円形である場合を示す。図35は、図15に示すタイプのユニットウエルを一枚の基板7上に12個設けた場合を示す。

【0071】図36は、2連式の独立したウエルユニットが円形に集積されている場合を示す。図36は各ウエルが貫通孔を有する場合を示しているが、貫通孔を有さない場合も有り得ることは言うまでもない。大きさを例示すると、ウエル2A及び2Bは半径方向の幅が1.5mm、流路の幅は0.5mmであり、10μm幅の溝5が設けられている。この場合、ユニット全体としての円の半径は5.0mmである。勿論、目的に応じて大きさを変えることができる。

【0072】図37は、図33〜図36に示される多数ユニットの集積を更に集積させた場合を示す。即ち、図37においてA<sub>1</sub>〜、B<sub>1</sub>〜、C<sub>1</sub>〜、D<sub>1</sub>〜で表される四角形の夫々が図33〜図36で示されるウエルユニットの集積である。ここで、A行、B行、C行及びD行は互いに異なったタイプのユニットの集積であることができる。

【0073】これら、多数のユニットを集積させる場合において、ブロック9は全てのユニットに夫々管を接続する1個のものとして構成することができ、ガラス基板

(10)

特開2003-180336

17

8も全体で1枚とすることができる。

【0074】11) ウェルと流路の作製

基板7の材質としては、微細加工が容易で、細胞に対し比較的不活性なシリコン単結晶が好ましい。流路1における降壁6及び溝5は、このシリコン単結晶に集積回路の製作で使用されるフォトリソグラフィやエッチング、例えば、ウェットエッチング、ドライエッチング等により工作される。ウェル2及び貫通孔3a、4aは降壁6や溝5に比べれば比較的大きいので様々な既知の工作技術を適用して作製することができ、例えば、サンドブラスト法やドライエッチング法を適用することができる。シリコン単結晶以外にも、硬質ガラス、硬質プラスチック、金属等も流路における微細な構造が構築可能であれば使用できる。プラスチックを使用する場合は、表面に親水性を付与するための処理、例えば、表面に親水性薄膜を形成させる処理を行うことが好ましい。なお、流路1とウェル2を夫々別に作製し、組合わせてもよい。

【0075】ウェットエッチングによる製作過程の一例を図38により説明すると、まず、シリコン単結晶基板の一部(1)に、(2)及び(3)に示す如く、溝5を形成させる。ここで、(2)は上面図であり、(3)は破線部における断面図である。次いで、溝5及び降壁6を残して全体を降壁の高さ(例えば、4.5μm)だけ掘り下げる(4)。その後、中央に土手10を残して、更に掘り下げてウェル2A、2Bを形成させ(5)、必要に応じ、サンドブラスト法等により、ウェルの底部に貫通孔3a、4aを設ける(6)。(7)は、(6)の上面図である。同様にして、ウェルユニットを集積させた基板も製作することができる。

【0076】12) 細胞走化性検出及び細胞分離装置の組立て  
本発明のウェルユニットを用いた細胞走化性検出及び細胞分離装置の組み立ては、図1のタイプの装置においては、基板7とガラス基板8とを組合わせることにより行うことができ、図3及び5のタイプの装置においては、基板7、ガラス基板8及びブロック9を組合わせることにより行うことができる。

【0077】ブロック9は図3、図5や図6に例示するように、ウェルに通じる管を有する部分である。物理的に可能であれば、ウェルの貫通孔3a或いは4aに管を直接装着してもよく、その場合は、ブロックは必要でない。管3、4の断面は、通常は四角形又は円形から選ばれる。管の太さは、特に限定されるものではないが、四角形の場合は1辺が1mm程度でよく、円形の場合は直径が1mm程度でよい。長さは、細胞浮遊液、検体溶液の容量を保持する上から、2mm～10mm程度は必要である。

【0078】ブロック又は管を構成する材質は、ガラス、アクリル等のプラスチック又は金属から選ぶことができ、ブロックや管は、通常の工作手段、例えば、機

18

械による鑿孔、レーザー光線による鑿孔その他により容易に作製される。また、光重合樹脂に光照射し、感光した部位を残し、感光しない部位を溶媒により溶解除去する方法により、工作することもできる。

【0079】ガラス基板8は、図1、図3、図5、図6に例示するように、基板7に圧着して液体を収納する空間を構成し、且つ流路を通過する細胞の観察を可能とするもので、光学的に透明且つ平面性を保持するものである。また、細胞が接着することが望ましい。かかる目的に達するものであれば、ガラス以外にも、透明アクリル等のプラスチックも使用できる。厚さは、特に限定されるものではないが、1～2mmあれば充分である。

【0080】図39は、本発明のウェルユニットを用いて細胞走化性検出及び走化細胞分離装置を組立てる場合の一例を示す。カバーキャップ17と中間支持体21の間にウェルユニットが形成された基板7、パッキング16とそれをカバーする1個のブロック9をおき、中間支持体21と底支持体22の間に1枚のガラス基板8をおき、ネジで締め付ける。ブロック9と基板7との位置関係は中間支持体21で規定され、中間支持体21に設けられたガイドピン20とブロック9の底面に設けられたガイドピン受孔19によって固定される。なお、基板7とブロック9とは直接圧着させてもよい。

【0081】13) 検出手段

本発明において用いられる検出手段は、流路を移動する細胞又は移動した後の細胞を検出する手段であり、必要に応じ検出結果を記録するための手段を含む。細胞を検出・記録するために知られている手段であれば何れも使用可能であり、例えば、顕微鏡、顕微鏡とビデオカメラの組合せ等である。対物レンズにCCDカメラを取り付けた構造を採用することもできる。集積ユニットの検出においては、対物レンズが各ユニットの流路を順次スキャンする構造を採用することが好ましい。

【0082】検出手段は、通常は、図1、図3、図5や図6に示すように、ユニットの流路に設定されるが、多数ユニットを集積させた装置においては、所定の位置に設置された検出器に各ユニットの列が順次移動し、検出・記録を行う構造を採ることもできる。その場合、検出は、直線上に並んでいる各ユニットの流路を検出器がスキャンすることにより行われる。その場合、検出器が各流路を一定時間毎に繰返し検出し、経時的に細胞の動きを捉えることも可能である。スキャンする検出器は1個でも良いし、複数個でもよい。かくすることにより、比較的少ない数の検出装置で多数の集積ユニットに対応することが可能となる。

【0083】流路を通過中、または、通過後の細胞の検出・計数は、細胞を直接顕微鏡やCCDカメラ、CCDビデオ等で捉えることにより行うこともできるが、手法に従い、予め細胞を蛍光・蛍光物質でマーキングしておき、その蛍光・蛍光を捕捉することにより容易に検出・

(11)

特開2003-180336

19

20

計数することができる。

【0084】

【発明の効果】本発明のウエルユニットを用いることにより、種々の目的に適した細胞走化性検出及び細胞分離装置を組み立てることができる。例えば、試料注入時に水平方向の圧力の変化（昇圧）が生じにくく、外圧による液体や細胞の移動が起こりにくい。細胞の自力による運動を正確に捉えることができる装置を得ることができる。走化性因子又は阻害剤の作用と細胞の性質を忠実に反映させた定量及び定性結果を得ることができる。

【0085】また、ボイデンチェンバーでは細胞のランダムムーブメントも捕捉されるため、走化性因子なしのバックグラウンドが高いのに対し、本発明のウエルユニットを用いる装置ではバックグラウンドをほぼゼロにすることができ、定量性も高い。

【0086】本発明のウエルユニットは、微量の試料を取り扱うことに適している。即ち、使用する細胞の量を、従来使用されてきたボイデンチェンバーに比べ、10分の1乃至1000分の1とすることが可能である。例えば、試料として全血を使用したとき、好中球の走化性を検出する場合は0.1 $\mu$ lの血液でよく、好酸球、単球又は好塩基球では1 $\mu$ l程度の血液で測定可能である。

【0087】更に、本発明のウエルユニットは微小なものとすることができるため、多数集積させることが可能であり、多数の試料を同時に処理する装置を組み立てることができる。且つ、装置の自動化が容易に行えるというメリットがある。

【0088】本発明のウエルユニットは、複数種の細胞を含む細胞培養液から、特定の細胞のみを移動させた後、これをウエルから採取するのに適しており、目的の細胞を的確に採取することができる。

【0089】本発明のウエルユニットは、流路1に土手を設けること、更には、土手に細胞の径又はその変形能に合わせた幅及び/又は深さの溝を種々の態様で設けること、或いは、土手に細胞の径又はその変形能に合わせた深さを形成する平面を設けることにより、細胞の個々の動きをより容易に捉えることが可能となる。また、土手を設けること、或いは土手に溝を構成する障壁を設けることにより、ウエルに入れた細胞が、走化開始前に流路の近傍に集まり、細胞の進行方向に向かって並ぶという状態が容易に作り出される。

【0090】本発明のウエルユニットによれば、複数種の細胞を含む試料、例えば、全血を用いて、その中に含まれる種々の血球の一部について、これを予め分離することなく、走化性を調べることができ、又、走化性因子を適当に選ぶことにより、複数種の細胞を含む試料から細胞を種類ごとに分離することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に関わるウエルユニットの使用態様の例を示す断面図

【図2】本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図

【図3】本発明に関わるウエルユニットの使用態様の例を示す断面図

【図4】本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図

【図5】本発明に関わるウエルユニットの使用態様の他の例を示し、(1)は装置の断面図であり、(2)は本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図である。

【図6】本発明に関わるウエルユニットの使用態様の他の例を示し、(1)は装置の断面図であり、(2)は本発明に関わるウエルユニットの一例を示す上面図である。

【図7】本発明のウエルユニットの一例であり、流路を介してウエルが直列に3個連通している場合を示す。

【図8】本発明のウエルユニットの一例であり、貫通孔を有するウエルが流路を介して直列に3個連通している場合を示す。

【図9】本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通している場合を示す。

【図10】本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通しており、ウエルに貫通孔が設けられている場合を示す。

【図11】本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルに複数のウエルが流路を介して連通しており、ウエルに貫通孔が設けられている場合を示す。

【図12】本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通している場合であって、全体として円形を構成している場合を示す。図は貫通孔が設けられている例を示す。

【図13】本発明のウエルユニットの一例であり、1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通している場合であって、全体として円形を構成している場合を示す。

【図14】1つのウエルを中心にして、複数のウエルが流路を介して連通していると共に、それら複数のウエルの内、2つづつが更に他の共通のウエルと流路を介して連通している場合を示す。図は貫通孔が設けられている例を示す。

【図15】流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの例を示す図である。

【図16】流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの他の例を示す図である。

【図17】流路の構造の一例を示す。

【図18】流路の構造の一例を示す。

【図19】流路の障壁の配列例。図において、矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図20】図19の断面図を示す。

【図21】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する1本の溝で連通している場合を示す。

(12)

特開2003-180336

21

22

す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図22】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する2本の溝で連通している場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図23】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する2本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝の幅が直交する溝を横切るとに段階的に変化する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。図は、隔壁自体の幅が変化する場合を示す。

【図24】図8の変形例で、隔壁の大きさは同じであるが、その数が増減する場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図25】流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する3本の溝で連通していると共に、相対するウエルに向かう方向の溝が、これに直交する溝を横切るとに相互の位置関係を変えている場合を示す。図では、2分の1ピッチ、直行する方向にシフトしている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図26】隔壁が相対するウエルに向かう方向に繋がっている場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図27】土手に、隔壁の列の両側にテラスを設け、一方が他方より長い場合を示す。図中矢印は相対するウエルに向かう方向を示す。

【図28】土手の中央にテラスを設け、テラスをはさんで隔壁の列を2箇所形成した例を示す。

【図29】流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの流路において、壁までテラスが設けられている例を示す。

【図30】流路に直交して壁が設けられたウエルユニットの流路において、壁までテラスが設けられている他の例を示す。

【図31】流路に直交して壁が一方のウエルにのみ設けられたウエルユニットの流路において、壁までテラスが設けられている例を示す。

【図32】流路における土手が多段に形成されている場合を示す。

【図33】多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユニットの集積例を示す。

【図34】多数ユニットの集積例であり、同一タイプのユ

ニットの集積例を示す。

【図35】多数ユニットの集積例であり、図15のウエルが集積配置された例を示す。

【図36】多数ユニットの集積例であり、円形タイプの集積例を示す。

【図37】多数ユニットの集積例であり、異なるタイプのユニットの集積例を示す。

【図38】流路及びウエルを作製する工程の一例を示す。

【図39】細胞走化性検出及び走化細胞分離装置の組立例を示す図であり、(1)は部品毎の斜視図、(2)は対応する断面図である。

【図40】土手に、細胞の移動を制限するための障害物を設ける場合の例を示す。

【符号の説明】

1：流路

2：ウエル。添字のA、B、B<sub>1</sub>、Cはウエルの区別を意味する(以下同じ)。

3：試料注入・採取用管。添字のaは管3に対応する貫通孔。添字のbは管3の上端部。

4：試料の注入・採取時における昇圧・減圧を回避するための管。添字のaは管4に対応する貫通孔。添字のbは管4の上端部。

5：流路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝

6：隔壁

7：基板

8：ガラス基板

9：管を穿ったブロック

10：土手

11、11<sub>1</sub>、…：テラス

12：溝5に直交する溝

13：検出器

14：流路に直交して設けられた壁

15：管3、4の上端部により共有される空間

16：パッキング

17：カバーキャップ

18：Oーリング

19：ガイドピン受孔

20：ガイドピン

21：中間支持体

22：底支持体

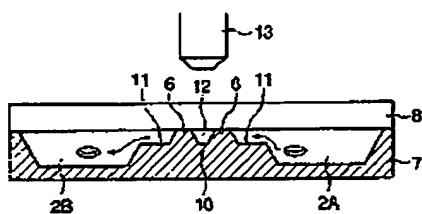
23：画面の位置決めのための印

24：障害物

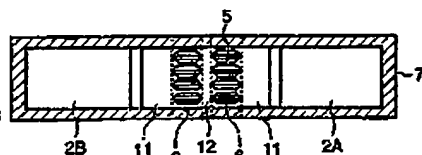
(13)

特開2003-180336

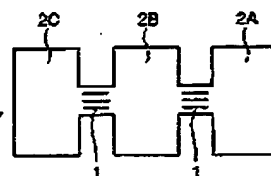
【図1】



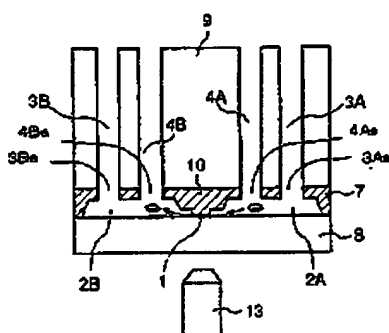
【図2】



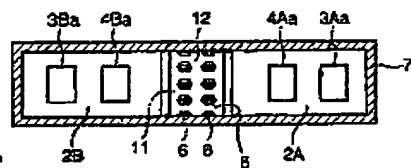
【図7】



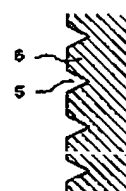
【図3】



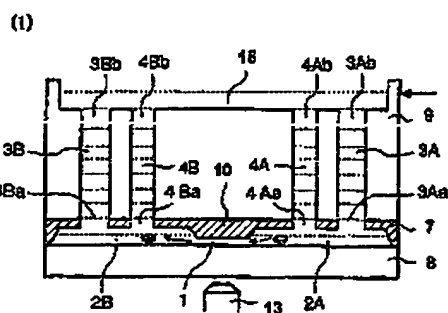
【図4】



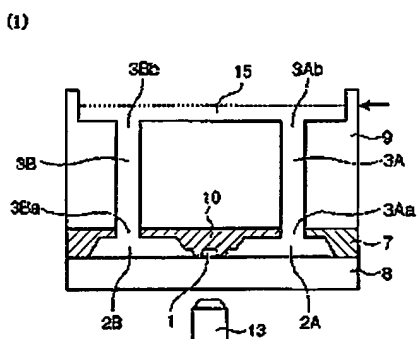
【図20】



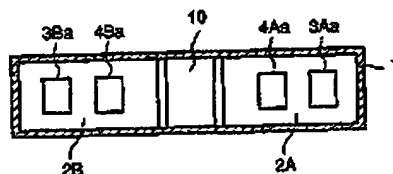
【図6】



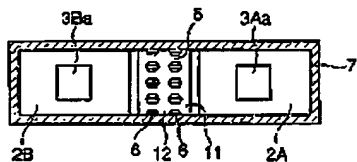
【図5】



(2)



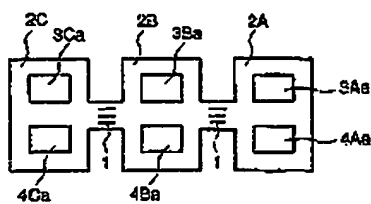
(2)



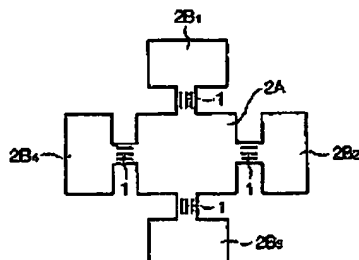
(14)

特開2003-180336

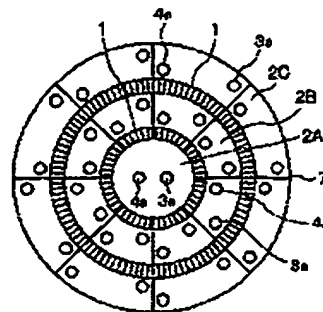
【図8】



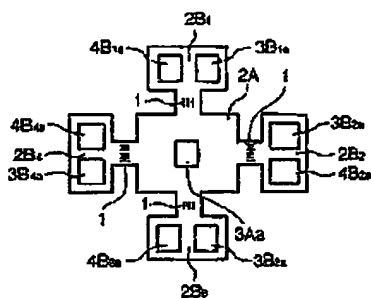
【図9】



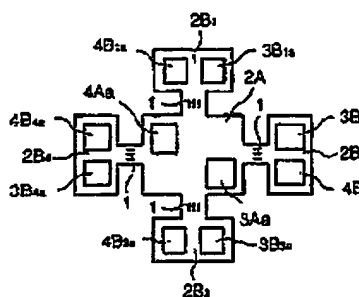
【図12】



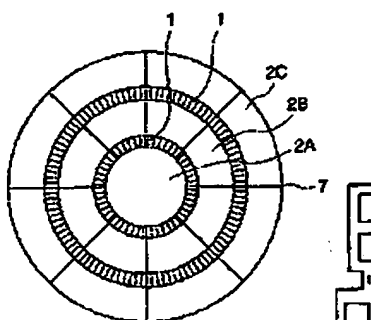
【図10】



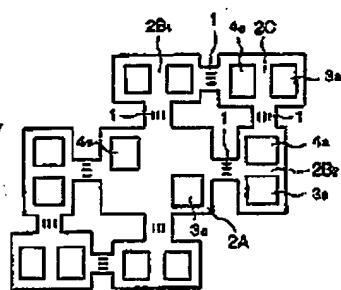
【図11】



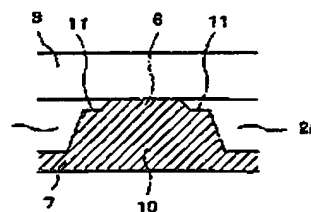
【図13】



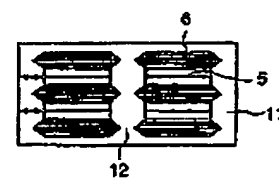
【図14】



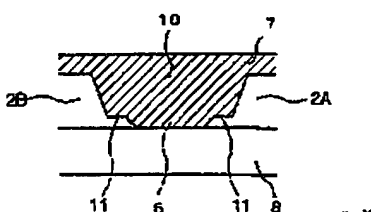
【図17】



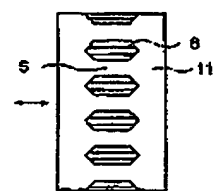
【図21】



【図18】



【図19】

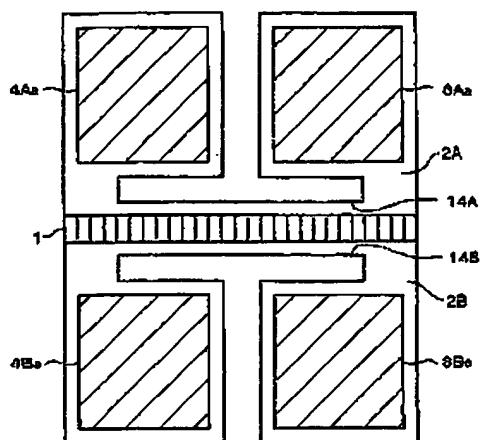


6: 抗路を挟んで相対するウエルに向かう方向の溝

(15)

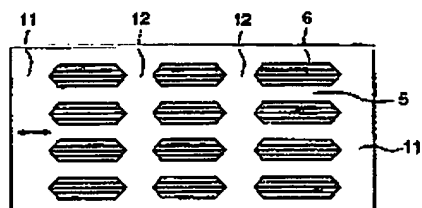
特開2003-180336

【図15】

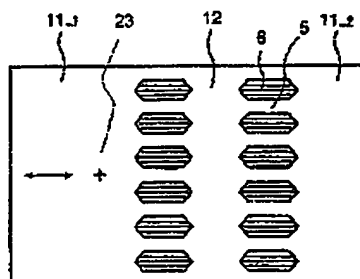


14: 両側に置き交して設けられた壁

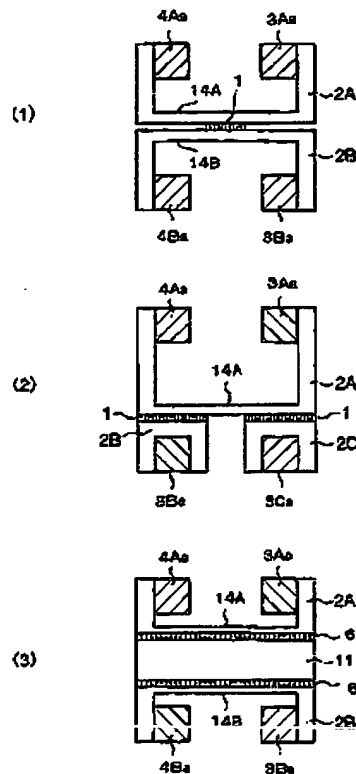
【図22】



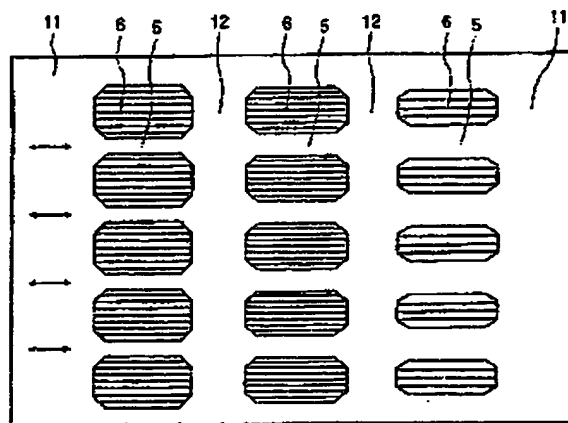
【図27】



【図16】



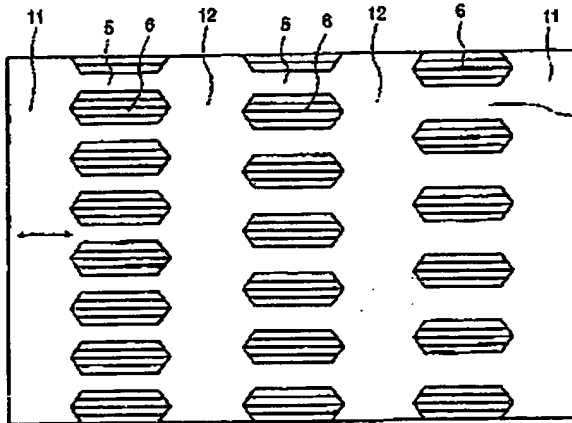
【図23】



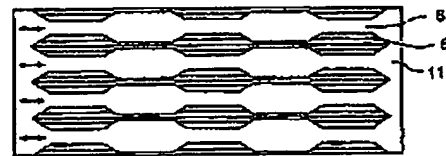
(15)

特開2003-180336

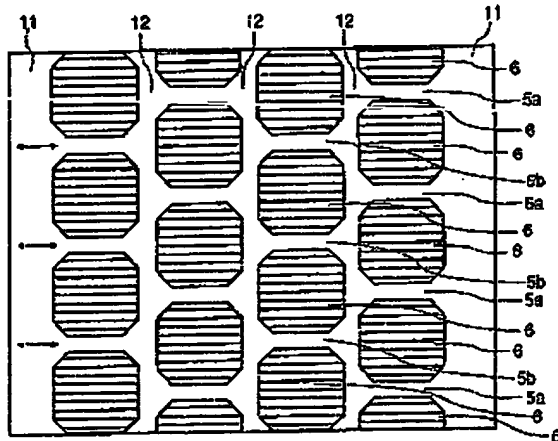
【図24】



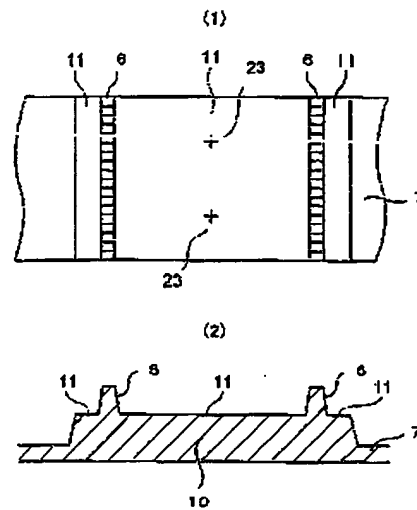
【図26】



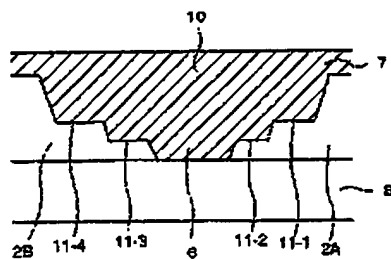
【図25】



【図28】



【図32】



JP,2003-180336,A

STANDARD ZOOM-UP ROTATION No Rotation REVERSAL

RELOAD

PREVIOUS PAGE

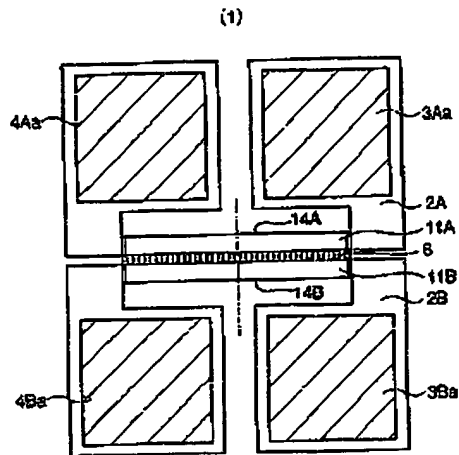
NEXT PAGE

DETAIL

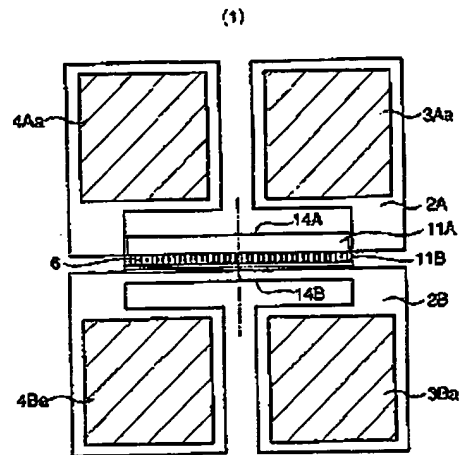
(17)

特開2003-180336

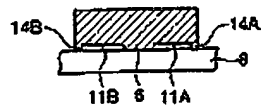
【図29】



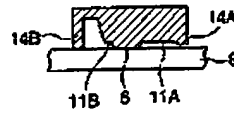
【図30】



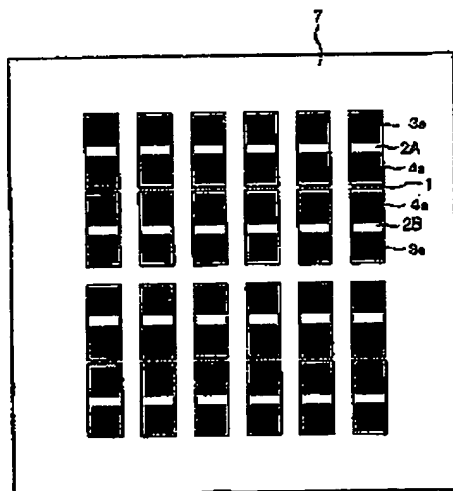
(2)



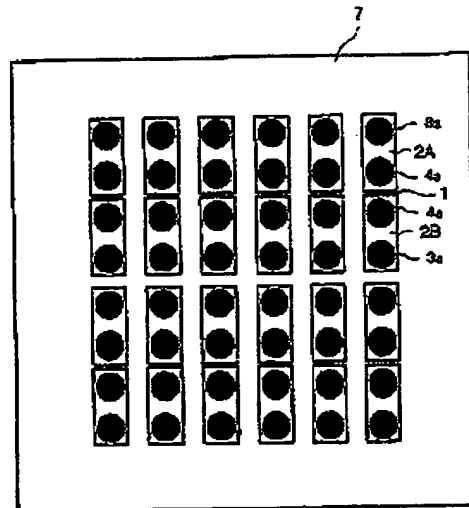
(2)



【図33】



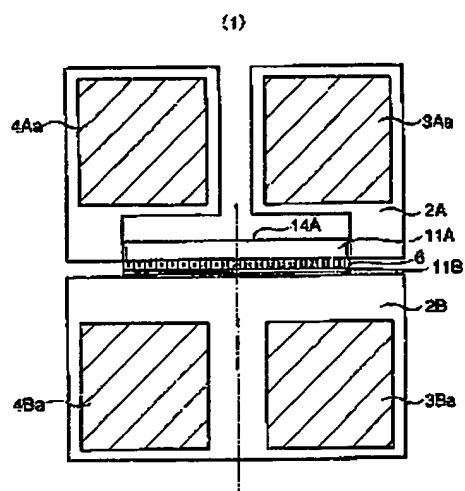
【図34】



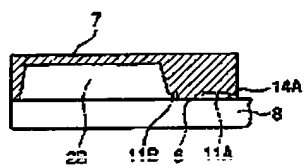
(18)

特開2003-180336

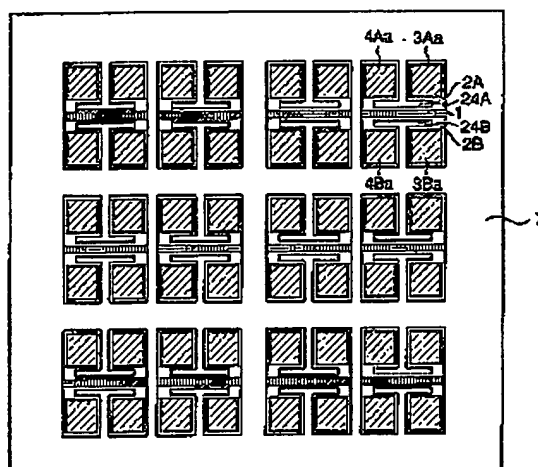
【図31】



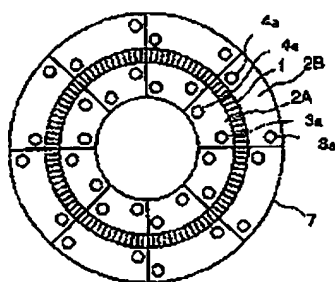
(2)



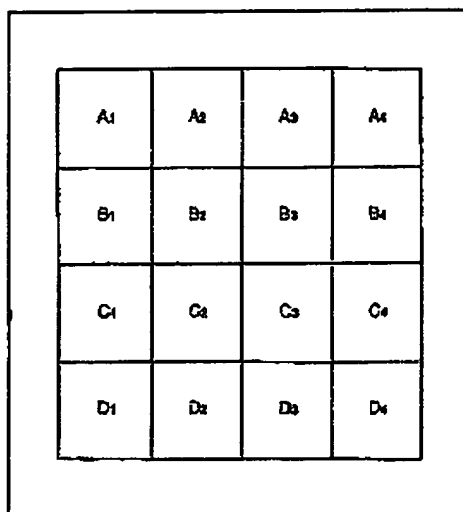
【図35】



【図36】



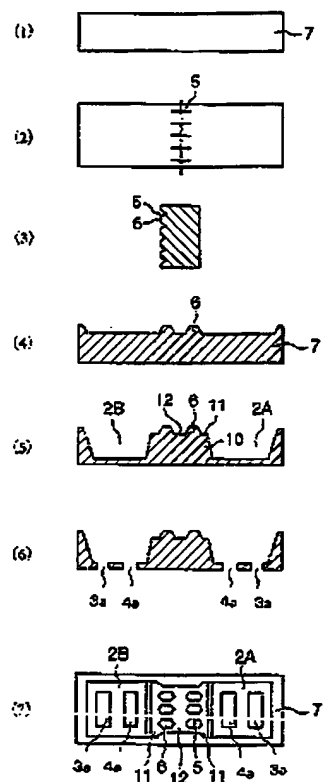
【図37】



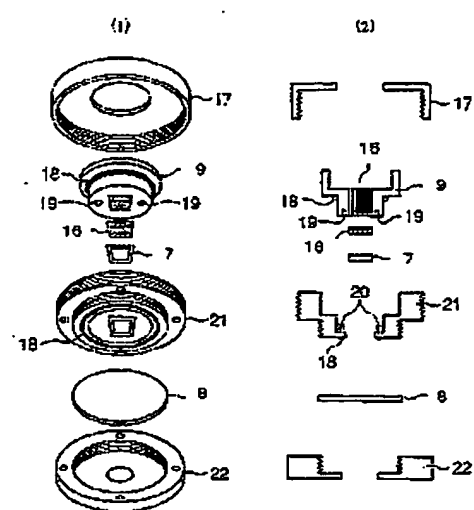
(19)

特開2003-180336

【図38】



【図39】

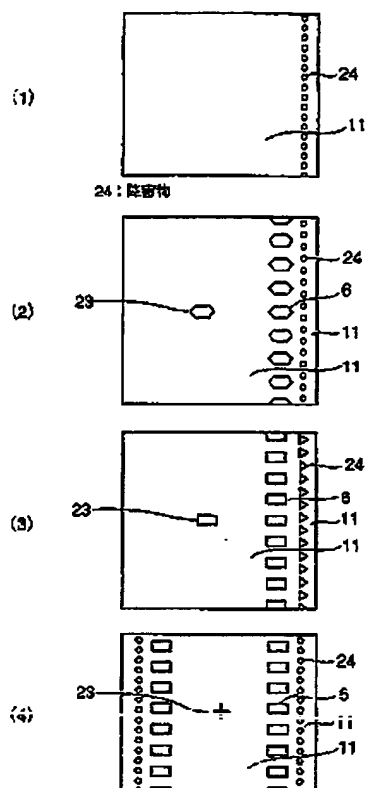


16: パッキング  
 17: カバーキャップ  
 18: O-リング  
 19: ガイドピン受孔  
 20: ガイドピン  
 21: 中間支持体  
 22: 電気弁体

(20)

特開2003-180336

【図40】




---

 フロントページの続き

(31)優先権主張番号 特願2001-258526(P2001-258526)

(32)優先日 平成13年8月28日(2001. 8. 28)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願2001-313205(P2001-313205)

(32)優先日 平成13年10月10日(2001. 10. 10)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(72)発明者 菊池 裕子

北海道小樽市桂岡町14番30

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA09 BB11 CC01 FA04

FA15 GA03 GB03 GB04 GB06

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**